

博士論文審査結果の要旨

学位申請者 足 立 博 子

主論文 1 編

Stage-specific reference genes significant for quantitative PCR during mouse retinal development.

Genes to Cells 20; 625-635, 2015

審 査 結 果 の 要 旨

遺伝子発現解析方法として広く利用されている定量 PCR 法では、測定対象のサンプルで一定に発現していることが期待されるリファレンス遺伝子の発現を解析対象遺伝子と同時に測定し、その定量値により目的遺伝子の測定値を補正することで、微細な遺伝子発現を正確に捉えることができる。リファレンス遺伝子には、組織や細胞において常に発現しているとされるハウスキーピング遺伝子が一般的に採用されているが、実際には出生前後のマウス網膜においてハウスキーピング遺伝子の発現は有意に変動しているため、リファレンス遺伝子とすることの妥当性が疑われていた。

申請者は、測定対象のサンプルにおける最適なリファレンス遺伝子を選択するための独自の方法を考案し、発生段階ごとに採取した網膜組織を用いてその有用性を検証した。網膜発生初期（妊娠 18 日齢および生後 0 日齢から 4 日齢）、網膜発生後期（生後 8 日齢から 14 日齢）、成熟期（4 週齢から 12 週齢）のマウス網膜を用いて定評のある 8 つのリファレンス遺伝子 (*Actb*, *Gapdh*, *Sdha*, *Hprt*, *Tbp*, *Rn18s*, *Rpl13a*, *Rplp0*) の定量 PCR を実施した。リファレンス遺伝子の選定には定量 PCR により測定された Ct 値を用いて、出生前後のマウス網膜において一定に発現している遺伝子を最適なリファレンス遺伝子を予測するためのツールである RefFinder により予測した。続いて、候補リファレンス遺伝子を用いて定量 PCR による視細胞分化に関連する遺伝子 (*Crx* および *Nrl*)、血管新生に関連する遺伝子 (*Vegfa* および *Kdr*) の測定値を補正した。さらに各リファレンス遺伝子により補正した定量 PCR の精度を検証するために最も定量性に優れていることが知られている SAGE 法による公共の遺伝子発現データベース、Mouse retina SAGE library と照合し、赤池情報量規準を用いて類似度を評価した。RefFinder による予測の結果、網膜発生初期および後期では *Sdha* がサンプル間において最も一定に発現している最適なリファレンス遺伝子であることが示された。また *Sdha* により補正した定量 PCR の結果は SAGE 法による *Crx*, *Vegfa* の遺伝子発現量と最も類似しており、*Kdr* との類似度は 2 番目に高かった。興味深いことに、リファレンス遺伝子として汎用されている *Actb* は、発生段階のみならず成熟した網膜においても発現量が一定ではなく、RefFinder ではいずれの発生段階においてもリファレンス遺伝子として適切ではないことが予測された。実際、*Actb* により補正した定量 PCR の結果は SAGE 法による *Crx*, *Nrl*, *Vegfa* および *Kdr* の遺伝子発現量との類似度が低く、発生段階の異なるマウス網膜サンプルを用いた定量 PCR において *Actb* により遺伝子発現量を補正すると、解析対象遺伝子の発現変動結果を誤認する恐れがあることが判明した。

以上が本論文の要旨であるが、定量 PCR 法において *Actb* などのハウスキーピング遺伝子をリファレンス遺伝子とすることの不適切性を明示し、リファレンス遺伝子进行评估する簡便かつ信頼性が高い方法として Mouse retina SAGE library と赤池情報量規準を用いる評価系を構築し、出生前後のマウス網膜では *Sdha* が最適であることを明らかにした点で、医学上価値ある研究と認める。

平成 28 年 11 月 17 日

審査委員 教授 伊 東 恭 子 ㊞

審査委員 教授 酒 井 敏 行 ㊞

審査委員 教授 外 園 千 恵 ㊞